

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590770

研究課題名(和文) 粉塵曝露に関わる腫瘍疾患・自己免疫疾患における免疫動態の包括的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis for immunological characteristics of tumor and autoimmune diseases related with mineral particles and fibers

研究代表者

西村 泰光(Nishimura, Yasumitsu)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90360271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：石綿とシリカ曝露に関連する悪性中皮腫(MM)と全身性強皮症(SSc)の病態背景における免疫学的特徴の解明は診断・治療に寄与する課題であり、末梢血を用いた免疫機能の広範な解析を行った。その結果、MMと胸膜プラーク(PL)陽性者は類似の特徴を示すが、MMでは制御性T(Treg)細胞マーカーが高く、細胞傷害性T細胞(CTL)機能はPLでも高いことが分かった。重回帰分析より算出された悪性中皮腫予測式は良好なROC曲線を示した。また、SScではTh17細胞機能が高かったが、珪肺(SIL)でもTh細胞上IL-1R1が高くTh17傾向にあり、主成分分析の結果はSILとSScの類似性と差違を明確に示した。

研究成果の概要(英文)：It is a crucial issue to clarify immunological characteristics of malignant mesothelioma (MM) and systemic sclerosis (SSc), diseases related with exposure to asbestos and silica respectively, which the present study examined by using peripheral blood specimens. Both MM patients and pleural plaque-positive (PL) individuals showed some similar characteristics, but regulatory T cell (Treg) marker was high in MM and cytotoxic T lymphocyte (CTL) function was high PL as well as MM. Multiple regression analysis of immunological parameters calculated a valuable prediction formula for malignant mesothelioma, which showed good ROC curve. Th17 function was high in SSc, while Th cells in silicois (SIL) showed high IL-1R1 expression, meaning a trend to Th17, and factor analysis of the parameters explained similarity and difference between SIL and SSc.

研究分野：衛生学、免疫学、免疫毒性学

キーワード：アスベスト シリカ 悪性中皮腫 自己免疫 全身性強皮症 T細胞 NK細胞

1. 研究開始当初の背景

アスベスト(石綿)や結晶シリカなどの鉱物粉塵(繊維・粒子)の吸入曝露は共通して肺線維化を引き起こし、石綿は石綿肺、シリカは珪肺として知られている。その一方、石綿曝露は悪性中皮腫(MM)や肺癌を引き起こすが、シリカ曝露は自己免疫疾患である全身性強皮症(SSc)の発症と関わることが知られている。MMは予後が悪く、治療には早期発見が不可欠とされる。他方、SScの発症メカニズムは明らかになっておらず、その治療法は確立されていない。そのような中、申請者等は、石綿曝露とシリカ曝露による免疫学的影響について明らかにしてきた。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、MM患者とSSc患者の末梢血を用いた免疫機能の分子免疫学的解析を行い、石綿曝露者である胸膜プラーク(PL)陽性者および珪肺(SIL)患者についても解析し、MMおよびSScの病態背景における免疫機能異常の包括的理解、および診断指標の構築を試みた。

3. 研究の方法

患者または健常人(HV)末梢血より血漿および末梢血単核球(PBMC)を分離し、血漿中サイトカイン・ケモカイン濃度をLuminex systemを用いて測定した。PBMCを蛍光標識抗体で染色し、Tヘルパー(Th)細胞・細胞傷害性Tリンパ球(CTL)・ナチュラルキラー(NK)細胞・単球上の膜タンパク質発現量をフローサイトメトリー(FCM)により測定した。PBMCの一部からFCMを用いてTh, CTL, NK, 単球を分取し、一部はそのまま凍結、残りはPMA/ionomycin刺激24時間後に凍結、後日realtime PCRにより免疫関連遺伝子mRNAレベルを測定した。有意差を示した指標群について重回帰分析および主成分分析を用いて解析した。

4. 研究成果

(1)研究の主な成果

PLとMMの免疫学的類似点と相違点が明確になった。両群ともNK細胞上Nkp46およびTh細胞上CXCR3発現量の低下を示したが、制御性T細胞(Treg)マーカーやTh細胞中TNF-mRNA量、数種の血中炎症性サイトカイン濃度はMMのみで高く、対照的にPLでは血中IFN-濃度が高値であることが分かった。また、MMだけでなく非担癌であるPLにおいてもCTLは高いgranzyme B mRNA量を示し、PL陽性者において抗腫瘍免疫が亢進していることが分かった。

有意差を示す指標群の重回帰分析により悪性中皮腫の予測式(M式)、胸膜プラーク(石綿曝露非担癌者)の予測式(P式)、石綿曝露者の予測式(A式)をそれぞれ得た。M式とP式は負の相関関係を示し、MMはM式値が高くPLはP式値が高く、また各式値のROC曲線は

感度・特異度共に良好であり、これらの予測式を用いた石綿曝露および悪性中皮腫予測の可能性が示された。

SILとSScは幾つかの類似の免疫学的特徴を示すことが分かった。両群のTh細胞ではTh17分化に働くIL-1R1発現量が高く、CTLは高いFasL発現量と高いgranzyme B mRNAレベルを示した。それらの知見から、SIL患者が自己免疫疾患に繋がる免疫学的状態であることが明らかとなった。また、SILではTh17細胞機能は高く無く、Tregマーカーがより亢進しており、SIL患者におけるTreg機能の自己免疫疾患発症抑制への寄与の可能性が示された。免疫指標群の主成分分析結果は、SILとSScのCTL機能の亢進とSScにおけるTh17細胞機能の亢進を良く説明した。

(2)得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

MM患者と石綿曝露非担癌者であるPL陽性者の免疫学的類似点と相違点が明らかとなった。加えて、MMまたは石綿曝露の診断に寄与する可能性のある予測式を構築することができた。MMは石綿曝露が原因であることは明白であるが、治療法は未だ確立されておらず、画像診断や病理組織・細胞診によるMMの診断は習熟を必要とし、国内外を問わずMMの予防と治療は新たな知見を必要としている状況に在る。従って、本研究で得られた知見および予測式は、MMおよび他の石綿曝露関連疾患の予防と治療に寄与する可能性が在る。また、SIL患者が多くの点でSSc患者と類似する免疫学的特徴を示すことが明らかとなった。中でもTh細胞上の高いIL-1R1発現量はTh17分化誘導に繋がる知見であり、SILと自己免疫疾患を関連づける具体的分子として注目に値する。加えて、SILにおける高いCTL機能は自己免疫応答の誘因を示唆する。シリカ曝露が引き起こすSILは労働衛生管理が十分でない国外において重要な課題である。また、SScは未だ発症機序が解明されていない自己免疫疾患である。本研究の知見は、珪酸曝露者における自己免疫疾患の予防と治療およびSScの病態解明に繋がる新規の基盤情報として大きな意味を持つ。

(3)今後の展望

本研究によりMMの予防および石綿曝露指標につながる重要な知見を得た。今後、これらの知見、特に各予測式の有効性について、更にMM患者の免疫機能解析をより大規模で行う必要がある。加えて、良性石綿胸水とMMの免疫学的差を知ることはMM診断に大きく寄与すると予想される。それらの解析を行うべく、現在研究体制を準備している。また、高いIL-1R1発現量を示すTh細胞のTh17細胞分化誘導能を調べることは、珪酸曝露者における自己免疫疾患の機序解明およびSScの病態解明に更に寄与すると考えられる。今後、それらに関する研究に取り組む予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

- 1) Nishimura Y, Kumagai-Takei N, Matsuzaki H, Lee S, Maeda M, Kishimoto T, Fukuoka K, Nakano T, Otsuki T, 2015. Functional alteration of natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes upon asbestos exposure and in malignant mesothelioma patients. *BioMed Res Int*:in press. 査読有り
<http://www.hindawi.com/journals/bmri/aa/238431/>
 - 2) 西村泰光, 武井直子, 松崎秀紀, 李順姫, 大槻剛巳, 2014. 【抗腫瘍免疫の抑制と活性化】アスベストによる抗腫瘍免疫の抑制. *臨床免疫・アレルギー科 (1881-1930)*, 61(6):585-91. 査読無し
 - 3) 西村泰光, 前田恵, 三浦由恵, 松崎秀紀, 李順姫, 武井直子, 大槻剛巳, 2014. アスベスト曝露による Th1 細胞機能の低下. *臨床免疫・アレルギー科 (1881-1930)*, 62(3):314-17. 査読無し
 - 4) 西村泰光, 三浦由恵, 前田恵, 松崎秀紀, 李順姫, 武井直子, 大槻剛巳, 2014. 【レギュラトリーT細胞の機能発現】制御性T細胞機能へのアスベスト曝露影響. *臨床免疫・アレルギー科 (1881-1930)*, 62(4):366-70. 査読無し
 - 5) 松崎秀紀, 前田恵, 林宏明, 武井直子, 李順姫, 吉留敬, 草加勝康, 浦上更三, 西村泰光, 兵藤文則, 大槻剛巳, 2014. 珪酸曝露による免疫影響. *日本予防医学会雑誌 (1881-4271)*, 9(1):1-8. 査読有り
 - 6) Maeda M, Chen Y, Hayashi H, Kumagai-Takei N, Matsuzaki H, Lee S, Nishimura Y, Otsuki T, 2014. Chronic exposure to asbestos enhances TGF-beta1 production in the human adult T cell leukemia virus-immortalized T cell line MT-2. *Int J Oncol*, 45(6):2522-32. 査読有り
DOI: 10.3892/ijo.2014.2682
 - 7) Lee S, Matsuzaki H, Kumagai-Takei N, Yoshitome K, Maeda M, Chen Y, Kusaka M, Urakami K, Hayashi H, Fujimoto W, Nishimura Y, Otsuki T, 2014. Silica exposure and altered regulation of autoimmunity. *Environ Health Prev Med*, 19(5):322-9. 査読有り
DOI: 10.1007/s12199-014-0403-9
 - 8) Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Maeda M, Hayashi H, Matsuzaki H, Lee S, Kishimoto T, Fukuoka K, Nakano T, Otsuki T, 2014. Functional properties of CD8(+) lymphocytes in patients with pleural plaque and malignant mesothelioma. *J Immunol Res*, 2014:10-20. 査読有り
DOI: 10.1155/2014/670140
 - 9) Nishimura Y, Maeda M, Kumagai-Takei N, Lee S, Matsuzaki H, Wada Y, Nishiike-Wada T, Iguchi H, Otsuki T, 2013. Altered functions of alveolar macrophages and NK cells involved in asbestos-related diseases. *Environ Health Prev Med*, 18(3):198-204. 査読有り
DOI: 10.1007/s12199-013-0333-y
 - 10) Matsuzaki H, Lee S, Kumagai-Takei N, Hayashi H, Miura Y, Chen Y, Maeda M, Yamamoto S, Hatayama T, Nishimura Y, Otsuki T, 2013. Exploration of Biomarkers for Asbestos Exposure and Occurrence of Malignant Mesothelioma Based on the Immunological Effects of Asbestos. *J Data Mining Genomics Proteomics*, 2:1-5. 査読有り
DOI: 10.4172/2153-0602.S2-001
 - 11) Maeda M, Chen Y, Kumagai-Takei N, Hayashi H, Matsuzaki H, Lee S, Hiratsuka J, Nishimura Y, Kimura Y, Otsuki T, 2013. Alteration of cytoskeletal molecules in a human T cell line caused by continuous exposure to chrysotile asbestos. *Immunobiology*, 218(9):1184-91. 査読有り
DOI: 10.1016/j.imbio.2013.04.007
 - 12) Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Maeda M, Hayashi H, Matsuzaki H, Lee S, Hiratsuka J, Otsuki T, 2013. Effect of asbestos exposure on differentiation of cytotoxic T lymphocytes in mixed lymphocyte reaction of human peripheral blood mononuclear cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 49(1):28-36. 査読有り
DOI: 10.1165/rcmb.2012-01340C
- [学会発表](計 18 件)
- 1) Nishimura Y, Lee S, Kumagai-Takei N, Matsuzaki H, Yoshitome K, Otsuki T. Functional Characteristics of Immune Cells in Peripheral Blood of Individuals with Pleural Plaque and Patients with Malignant Mesothelioma (Platform Session: Inflammation in Disease Due to Environmental Exposures) (3/25). The 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2015.3/22-26, San Diego Convention Center in San Diego, California, USA
 - 2) 西村泰光, 李順姫, 武井直子, 松崎秀紀, 吉留敬, 岸本卓巳, 福岡和也, 田端千春, 中野考司, 大槻剛巳. 胸膜プラーク陽性

- 者および悪性中皮腫患者末梢血の包括的免疫機能解析. 第 85 回日本衛生学会学術総会 2015.3/26-28 和歌山県民文化会館・ホテルアバローム紀の国. 和歌山
- 3) Nishimura Y, Lee S, Kumagai-Takei N, Matsuzaki H, Otsuki T. Immunological similarity and difference between individuals positive for pleural plaque with malignant mesothelioma, revealed by analysis for mRNA levels. The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology (2014 日本免疫学会学術集会)2014.12/10-12. 京都国際会館. 京都
 - 4) Nishimura Y. Autoimmunity related with silica exposure: silicosis and scleroderma as representative diseases. International Workshop "The role of inorganic particles in pulmonary, systemic and autoimmune diseases". 2014.11/14-15. Sceinces Po. Salle GOGUEL, 56 rue des Saints-Pères, 75007 Paris, France
 - 5) 西村泰光, 李順姫, 武井直子, 松崎秀紀, 岸本卓巳, 福岡和也, 田端千春, 中野孝司, 大槻剛巳. 悪性中皮腫患者および胸膜プラーク陽性者の末梢血における免疫学的特徴. 第 5 回 JMIG (Japan Mesothelioma Interest Group) 研究会. 2014.9/20. 京都私学会館. 京都
 - 6) Nishimura Y, Lee S, Kumagai-Takei N, Matsuzaki H, Yoshitome K, Otsuki T. Immunological similarity and difference observed in analyses for mRNAs, cell surface molecules and plasma cytokines between silicosis and systemic scleroderma. The 21st Asian Conference on Occupational Health 2014.9/2-4. Hilton Fukuoka Sea Halk. 福岡
 - 7) 西村泰光, 李順姫, 武井直子, 松崎秀紀, 大槻剛巳. 珪酸が黒関連疾患における免疫動態の包括的解析.(日本毒性学会・日本免疫毒性学会合同シンポジウム「次世代が切り拓く革新的免疫毒性研究」). 第 41 回日本毒性学会学術年会 2014.7/2-4. 神戸コンベンションセンター. 神戸
 - 8) 西村泰光, 李順姫, 武井直子, 松崎秀紀, 林宏明, 藤本亘, 守田吉孝, 草加勝康, 大槻剛巳. 珪肺患者および全身性強皮症患者における免疫動態の類似性および相違. 第 84 回日本衛生学会学術総会 2014.5/25-27. 岡山コンベンションセンター. 岡山
 - 9) 西村泰光, 李順姫, 武井直子, 松崎秀紀, 林宏明, 藤本亘, 守田吉孝, 草加勝康, 大槻剛巳. 多面的免疫機能解析による珪肺と全身性強皮症の比較. 第 87 回日本産業衛生学会 2014.5/22-24 岡山コンベンションセンター. 岡山
 - 10) Nishimura Y, Lee S, Kumagai-Takei N, Matsuzaki H, Hayashi H, Fujimoto W, Morita Y, Kusaka M, Otsuki T. The characteristics of activated lymphocytes in silicosis differing in Th17 phenotype from systemic sclerosis (Oral). The 53rd annual Meeting. Society of Toxicology, 2014.3/23-27. Poenix Convention Center, Arizona, USA
 - 11) 西村泰光, 李順姫, 武井直子, 松崎秀紀, 藤本亘, 林宏明, 守田吉孝, 大槻剛巳. 珪肺症と強皮症における免疫機能亢進の類似および Th 細胞機能の相違. 第 13 回分子予防環境医学研究会 2014.1/31-2/1. 和歌山県民文化会館. 和歌山
 - 12) 西村泰光, 2014.1/11. 特別講演: 珪酸・アスベストの免疫影響. 第 13 回肺分子病態研究会. ホテルレオパレス博多. 福岡
 - 13) Nishimura Y, Lee S, Kumagai-Takei N, Matsuzaki H, Otsuki T, 2013.12/11-13. Immunological analysis for patients with silicosis or systemic scleroderma. 第 42 回日本免疫学会・学術集会. 幕張メッセ. 千葉
 - 14) Nishimura Y, Kumagai-Takei N, Matsuzaki H, Lee S, Otsuki T. Suppressive effects of exposure to multi-walled carbon nanotubes and asbestos on NK cell function. 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health. 2013. 10/28-31, Nagoya Congress Center, Nagoya
 - 15) 西村泰光, 李順姫, 武井直子, 松崎秀紀, 前田恵, 岸本卓巳, 福岡和也, 中野孝司, 大槻剛巳, 2013.8/31. 胸膜プラーク陽性者の血漿および末梢血単核球における免疫学的特徴 第 4 回 JMIG 研究会 (Japan Mesothelioma Interest Group). 京都私学会館. 京都
 - 16) 西村泰光, 李順姫, 武井直子, 松崎秀紀, 岸本卓巳, 大槻剛巳, 2013. 5/15-17 石綿曝露者および悪性中皮腫患者における免疫動態の解析 第 86 回日本産業衛生学会. 姫銀ホール. 松山
 - 17) 西村泰光, 李順姫, 武井直子, 松崎秀紀, 林宏明, 藤本亘, 守田吉孝, 岸本卓巳, 大槻剛巳, 2013. 悪性中皮腫および全身性強皮症患者における免疫関連遺伝子発現動態の解析 第 83 回日本衛生学会 2013.3/24-26. 金沢大学鶴間・宝町キャンパス. 金沢
 - 18) Nishimura Y, Kumagai-Takei N, Matsuzaki H, Lee S, Otsuki T. Effects of asbestos exposure on regulatory role of NK cells for expanded

autologous CD4+ T cells. The 52nd Annual Meeting, Society of Toxicology. 2013.3/10-14 Henry B. Gonzalez Convention Center in San Antonio, Texas, USA

〔図書〕(計1件)

- 1) Lee S, Maeda M, Hayashi H, Matsuzaki H, Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Otsuki T. Immunostimulation by silica particles and the development of autoimmune dysregulation. "Immunostimulation", ISBN 980-953-307-1094-2. (in press) InTech publisher, Croatia
DOI: 10.5772/57544

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 泰光 (NISHIMURA YASUMITSU)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90360271

(2) 研究分担者

大槻 剛巳 (OTSUKI TAKEMI)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：40160551

武井 直子 (TAKEI NAOKO)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号：00509276

松崎 秀紀 (MATSUZAKI HIDENORI)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号：80335463

李 順姫 (LEE SUNI)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号：70414026

藤本 亘 (FUJIMOTO WATARU)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：50165429

林 宏明 (HAYASHI HIROAKI)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：60388965

(3) 連携研究者

()

研究者番号：